

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP03/10687

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 45 993.2

REC'D 19 APR 2004

WIPO PCT

Anmeldetag:

02. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber:

Consortium für elektrochemische Industrie GmbH,
81379 München/DE

Bezeichnung:

Zellen zur fermentativen Herstellung von R- α -
Liponsäure

IPC:

C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Kahle

Zellen zur fermentativen Herstellung von R- α -Liponsäure

Die Erfindung betrifft Zellen, die R- α -Liponsäure sekretieren und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- α -Liponsäure unter Verwendung dieser Zellen.

R- α -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- α -Liponsäure jeweils kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- α -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppenüberträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren. Außerdem fungiert Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

α -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der α -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme. α -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " α -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der α -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz zu verstehen.

Die Biosynthese von R- α -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-ACP) übertragen, wobei R- α -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Sulfurtransferase Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-],

dem *lipA*-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- α -Liponsäure von R- α -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem *lipB*-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- α -Lipoyl-ACP oder R- α -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178).

Über die Biosynthese von R- α -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- α -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh die Bedeutung der α -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt:

α -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist α -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der α -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder α -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der α -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu.

α -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden eingesetzt.

Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der α -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersu-

chungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der α -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im *in vitro*-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- α -Liponsäure zur Bildung funktioneller α -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- α -Liponsäure. Die Reduktion von α -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen α -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R- α -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulin-resistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert, α -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von α -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Yadav et al., 1990, J. Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der α -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et. al, 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen einge-

führt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner α -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

Die Anmeldung am Deutschen Patent und Markenamt mit dem Aktenzeichen 10235270.4 beschreibt Zellen, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure sekretieren sowie ein Verfahren, bei dem die Produktion von enantiomerenreiner R- α -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozeß erfolgt. Dabei führt die Überexpression eines Liponsäure-Synthase-Gens dazu, dass die Zellen freie R- α -Liponsäure in das Kulturmedium ausscheiden, allerdings in noch sehr beschränktem Ausmaß.

Nur in seltenen Fällen führt eine einzige genetische Manipulation im Zuge des sogenannten "metabolic engineering" eines Wildtypstammes zur Überproduktion der gewünschten Verbindung in ausreichendem Umfang.

Entsprechend ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, leistungsfähige Zellen, welche enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Zellen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen (*lipB*-Gen) überexprimieren.

Unter der vom *lipB*-Gen codierten Enzymaktivität ist dabei diejenige Lipoyl-Protein-Ligase-Aktivität einer Zelle zu verstehen, welche eine strikte Präferenz für R- α -Lipoyl-ACP gegenüber freier R- α -Liponsäure als Substrat aufweist (s. Fig. 1).

Unter einer Überexpression ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass das Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Zelle, aus der das Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert wird.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität der durch das Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase B erhalten bleibt.

Um eine Überexpression des *lipB*-Gens in der Zelle zu erreichen, kann die Kopienzahl des *lipB*-Gens in einer Zelle erhöht sein und/oder es kann die Expression des *lipB*-Gens, vorzugsweise durch geeignete Promotoren, gesteigert sein.

Durch die Überexpression eines *lipB*-Gens ist die Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität der Zelle jeweils um mindestens den gleichen Faktor gesteigert.

Vorzugsweise überexprimiert eine erfindungsgemäße Zelle ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen, das für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.

Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

5 In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

10 Die Erhöhung der Kopienzahl eines *lipB*-Gens in einer Zelle kann mit dem Fachmann bekannten Methoden erreicht werden. So kann zum Beispiel ein *lipB*-Gen in einen Plasmid-Vektor mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 für *Escherichia coli*) kloniert und in die Zelle eingebracht
15 werden. Alternativ kann ein *lipB*-Gen mehrfach ins Chromosom einer Zelle integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617-4622).
20

Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines *lipB*-Gens in einen Plasmid-Vektor unter Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl in *Escherichia coli* durch Klonierung eines *lipB*-Gens in ein pBAD-Derivat wie z. B. pBAD-GFP (Cramer et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 315-319). Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein *lipB*-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.

30 .

Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-codierten *lipB*-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des *lipB*-Gens dienen, die verstärkte Expression eines *lipB*-Gens kann jedoch insbesondere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme, die entweder eine an-
35 dauernde oder eine kontrollierte, induzierbare Expression des Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens ermöglichen wie beispielsweise in *Escherichia coli* der konstitutive GAPDH-Promotor des *gapA*-Gens

oder die induzierbaren lac-, tac-, trc-, lambda-, ara oder tet-Promotoren, sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Solche Konstrukte können in an sich bekannter Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform für die Klonierung eines *lipB*-Gens wird ein Plasmid verwendet, das bereits einen Promotor zur verstärkten Expression enthält, wie beispielsweise das induzierbare Arabinose-Promotor/Repressorsystem von *Escherichia coli*.

Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind, oder dass gemäß der "codon usage" seltene Codons gegen häufiger vorkommende Codons ausgetauscht werden.

Bevorzugt enthalten erfindungsgemäße Zellen ein Plasmid mit einem *lipB*-Gen sowie den genannten Modifikationen der Regulationssignale. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das native schwache Startcodon des *lipB*-Gens (TTG) durch das starke Startcodon ATG ersetzt.

Die Klonierung eines *lipB*-Gens in einen Plasmid-Vektor erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation eines *lipB*-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette *lipB*-Gen erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.

Erfindungsgemäße Zellen, die eine gegenüber einer Ausgangszelle erhöhte Expression eines *lipB*-Gens und verbunden damit eine gesteigerte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie aus einer Ausgangszelle erzeugt werden.

In einer Vielzahl von Zellen konnten Lipoyl-Protein-Ligase B-Gene identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- α -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

Als Ausgangszellen sind auch solche Zellen besonders geeignet, die durch eine verstärkte Expression des *lipA*-Gens bereits eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität aufweisen.

Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die *lipB*-haltigen Plasmide in eine Ausgangszelle eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, ein Fermentationsverfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine erfindungsgemäße Zelle in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausschei-

det und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

Die Gewinnung von R- α -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie Zentrifugation des Mediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion oder Präzipitation des Produkts erfolgen.

Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- α -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178). Überraschenderweise wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass die Überexpression eines Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- α -Liponsäure im Kulturmedium des Wirtsorganismus führt. Dies wiederum erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen, bzw. ohne dass die R- α -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der α -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- α -Liponsäure erfolgt vorzugsweise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren verwendet werden. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) als spezifische Vorstufen für die α -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 1-30 g/l.

Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

Als optimaler Temperaturbereich werden 15 - 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- α -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (*lipA*-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- α -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645), würde allerdings auch ohne supplementierte R- α -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- α -Liponsäure zu vermeiden - beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- α -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat - erfolgt bereits die Anzucht des R- α -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110 / pBAD-lipB, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15180 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiel 1: Konstruktion des Vektors pBAD-lipB**A. Amplifizierung des *lipB*-Gens**

Das *lipB*-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Mat-
5 rize diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide *lipB*-fwd und *lipB*-rev mit folgenden Sequenzen verwendet:

10 *lipB*-fwd: (SEQ ID NO: 3)

5' - CAC GGA GAT GCC CAT ATG TAT CAG GAT AAA ATT C - 3'
NdeI

15 *lipB*-rev: (SEQ ID NO: 4)

5' - ATT GGG CCA TTG ATG TAT GGA ATT AAG CGG - 3'

20 Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 0,68 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptions-säulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

B. Klonierung des *lipB*-Gens in den Vektor pKP477

In das PCR-Fragment wurde über die Primer-Sequenz von *lipB*-fwd eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *NdeI* (Erkennungssequenz im Oligonukleotid unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuclease *NdeI* unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen
30 geschnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des GENECLEAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Der Klonierungs- und Expressionsvektor pKP477 wurde wie folgt
35 aus dem Vektor pBAD-GFP (Cramer et al.; 1996, Nat. Biotechnol. 14: 315-319), einen Derivat des Vektors pBAD18, erhalten: Zunächst wurde das GFP-Gen durch Restriktion des Vektors pBAD-GFP mit den Endonukleasen *NheI* und *EcoRI* entfernt. Die 5'-

überhängenden Enden des verbleibenden ca. 4,66 kb langen Vektor-Fragments wurden dann mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und der Vektor schließlich unter Verwendung der T4-Ligase religiert. Die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α mit dem Ligationsansatz erfolgte mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert. Der so erhaltene Vektor trägt die Bezeichnung pKP476.

Um die zweite, sich in der Nähe des Replikationsursprungs befindliche *Nde*I-Schnittstelle des Vektors pKP476 zu entfernen, erfolgte zunächst eine Partialrestriktion des Vektors pKP476 mit *Nde*I in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Das linearisierte, d. h. nur einmal geschnittene Vektorfragment wurde wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurden die 5'-überhängenden Enden dieses Fragments mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und der Vektor wie oben beschrieben religiert, transformiert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. In dem so entstandenen Plasmid pKP477 befindet sich nun die singuläre *Nde*I-Schnittstelle in einem optimalen Abstand zu einer optimierten Ribosomenbindestelle.

Das Plasmid pKP477 enthält verschiedene genetische Elemente, die eine kontrollierte Expression eines beliebigen Gens erlauben. Es handelt sich dabei um einen Vektor mit einem von der pBR-Plasmidfamilie abgeleiteten Replikationsursprung. Die Expression des klonierten Gens wird durch den AraC-Repressor unterdrückt und kann durch Arabinose induziert werden.

Zur Klonierung des *lipB*-Gens wurde der Vektor pKP477 mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Sma*I unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das *lipB*-PCR-Fragment mittels der GENE-CLEAN-Methode gereinigt.

Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pKP477, die Transformation und die Überprüfung der Transformanden erfolgte wie oben beschrieben. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pBAD-lipB (Fig. 2).

Beispiel 2: Herstellung eines Produzenten von R- α -Liponsäure

Das in Beispiel 1 beschriebene Plasmid pBAD-lipB wurde mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus einer der Transformanden reisoliert, mit Restriktionsendonucleasen gespalten und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pKP477 wurde in analoger Weise verfahren.

Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- α -Liponsäure

Für die fermentative Produktion von R- α -Liponsäure wurde der Stamm W3110 / pBAD-lipB verwendet. Als Vergleich diente der Stamm W3110 mit dem "leeren" Kontrollplasmid pKP477, der unter exakt denselben Bedingungen kultiviert wurde.

Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l K₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 1 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,1 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,5 g/l Na₃Citrat x 3 H₂O; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l Na₂Succinat x 6 H₂O; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler für 24 h. Die Expression des Liponsäure-Synthase-Gens wurde durch Zugabe von 0,2 g/l L-Arabinose nach ca. 4 h Inkubation induziert. Nach 24 h wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- α -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970,

Meth. Enzymol. 18A: 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- α -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand nach 24 h Inkubation:

5 Tabelle 1:

| Stamm | R- α -Liponsäure [μ g/l] |
|-------------------|--------------------------------------|
| W3110 / pBAD-lipB | 24 |
| W3110 / pKP477 | 0 |

SEQUENZ PROTOKOLL

```

5  <110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH
    <120> Zellen zur fermentativen Herstellung von
        R-alpha-Liponsaeure
10  <130> Co10219
    <140>
    <141>
    <160> 4
15  <170> PatentIn Ver. 2.0
    <210> 1
    <211> 679
20  <212> DNA
    <213> Escherichia coli
    <220>
    <221> CDS
25  <222> (16)..(654)
    <300>
    <301> Reed, Kelynn E.
        Cronan Jr., John E.
30  <302> Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: Sequencing
        and Functional Characterization of the lipA and lipB
        Genes
    <303> J. Bacteriol.
    <304> 175
35  <305> 5
    <306> 1325-1336
    <307> 1993
    <400> 1
40  cacggagatg cccat atg tat cag gat aaa att ctt gtc cgc cag ctc ggt 51
        Met Tyr Gln Asp Lys Ile Leu Val Arg Gln Leu Gly
           1                     5                     10
45  ctt cag cct tac gag cca atc tcc cag gct atg cat gaa ttc acc gat 99
        Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Ile Ser Gln Ala Met His Glu Phe Thr Asp
           15                     20                     25
50  acc cgc gat gat agt acc ctt gat gaa atc tgg ctg gtc gag cac tat 147
        Thr Arg Asp Asp Ser Thr Leu Asp Glu Ile Trp Leu Val Glu His Tyr
           30                     35                     40
        ccg gta ttc acc caa ggt cag gca gga aaa gcg gag cac att tta atg 195
        Pro Val Phe Thr Gln Gly Gln Ala Gly Lys Ala Glu His Ile Leu Met
           45                     50                     55                     60

```


| | | |
|----|---|-----|
| | ccg ggt gat att ccg gtg atc cag agc gat cgc ggt ggg cag gtg act | 243 |
| | Pro Gly Asp Ile Pro Val Ile Gln Ser Asp Arg Gly Gly Gln Val Thr | |
| | 65 70 75 | |
| 5 | tat cac ggg ccg ggg caa cag gtg atg tat gtg ttg ctt aac ctg aaa | 291 |
| | Tyr His Gly Pro Gly Gln Gln Val Met Tyr Val Leu Leu Asn Leu Lys | |
| | 80 85 90 | |
| 10 | cgc cgt aaa ctc ggt gtg cgt gaa ctg gtg acc ttg ctt gag caa aca | 339 |
| | Arg Arg Lys Leu Gly Val Arg Glu Leu Val Thr Leu Leu Glu Gln Thr | |
| | 95 100 105 | |
| 15 | gtg gtg aat acc ctg gct gaa ctg ggt ata gaa gcg cat cct cgg gct | 387 |
| | Val Val Asn Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ile Glu Ala His Pro Arg Ala | |
| | 110 115 120 | |
| 20 | gac gcg cca ggt gtc tat gtt ggg gaa aag aaa att tgc tca ctg ggt | 435 |
| | Asp Ala Pro Gly Val Tyr Val Gly Glu Lys Lys Ile Cys Ser Leu Gly | |
| | 125 130 135 140 | |
| 25 | tta cgt att cga cgc ggt tgt tca ttc cac ggt ctg gca tta aac gtc | 483 |
| | Leu Arg Ile Arg Arg Gly Cys Ser Phe His Gly Leu Ala Leu Asn Val | |
| | 145 150 155 | |
| 30 | aat atg gat ctt tca cca ttt tta cgt att aat cct tgt ggg tat gcc | 531 |
| | Asn Met Asp Leu Ser Pro Phe Leu Arg Ile Asn Pro Cys Gly Tyr Ala | |
| | 160 165 170 | |
| 35 | gga atg gaa atg gct aaa ata tca caa tgg aaa ccc gaa gcg acg act | 579 |
| | Gly Met Glu Met Ala Lys Ile Ser Gln Trp Lys Pro Glu Ala Thr Thr | |
| | 175 180 185 | |
| 40 | aat aat att gct cca cgt tta ctg gaa aat att tta gcg cta cta aac | 627 |
| | Asn Asn Ile Ala Pro Arg Leu Leu Glu Asn Ile Leu Ala Leu Leu Asn | |
| | 190 195 200 | |
| 45 | aat ccg gac ttc gaa tat att acc gct taattccata catcaatggc ccaat | 679 |
| | Asn Pro Asp Phe Glu Tyr Ile Thr Ala | |
| | 205 210 | |
| | <210> 2 | |
| | <211> 213 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Escherichia coli | |
| | <400> 2 | |
| 50 | Met Tyr Gln Asp Lys Ile Leu Val Arg Gln Leu Gly Leu Gln Pro Tyr | |
| | 1 5 10 15 | |
| | Glu Pro Ile Ser Gln Ala Met His Glu Phe Thr Asp Thr Arg Asp Asp | |
| | 20 25 30 | |
| 55 | Ser Thr Leu Asp Glu Ile Trp Leu Val Glu His Tyr Pro Val Phe Thr | |

| | 35 | 40 | 45 |
|----|---|-----|-----|
| | Gln Gly Gln Ala Gly Lys Ala Glu His Ile Leu Met Pro Gly Asp Ile | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| 5 | Pro Val Ile Gln Ser Asp Arg Gly Gly Gln Val Thr Tyr His Gly Pro | | |
| | 65 | 70 | 75 |
| | Gly Gln Gln Val Met Tyr Val Leu Leu Asn Leu Lys Arg Arg Lys Leu | | |
| 10 | | 85 | 90 |
| | Gly Val Arg Glu Leu Val Thr Leu Leu Glu Gln Thr Val Val Asn Thr | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| 15 | Leu Ala Glu Leu Gly Ile Glu Ala His Pro Arg Ala Asp Ala Pro Gly | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| | Val Tyr Val Gly Glu Lys Lys Ile Cys Ser Leu Gly Leu Arg Ile Arg | | |
| 20 | | 130 | 135 |
| | Arg Gly Cys Ser Phe His Gly Leu Ala Leu Asn Val Asn Met Asp Leu | | |
| | 145 | 150 | 155 |
| 25 | Ser Pro Phe Leu Arg Ile Asn Pro Cys Gly Tyr Ala Gly Met Glu Met | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| | Ala Lys Ile Ser Gln Trp Lys Pro Glu Ala Thr Thr Asn Asn Ile Ala | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| 30 | Pro Arg Leu Leu Glu Asn Ile Leu Ala Leu Leu Asn Asn Pro Asp Phe | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| | Glu Tyr Ile Thr Ala | | |
| | 210 | | |

35

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
lipB-fwd

45

<400> 3

cacggagatg cccatatgta tcaggataaa attc

34

50

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

55

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
lipB-rev

<400> 4

5 attgggccat tgatgtatgg aattaagcgg

30

Patentansprüche

- 5 1. Zelle, die enantiomerenreine R- α -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen (*lipB*-Gen) überexprimiert.
- 10 2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle aus der das Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert.
- 15 3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder eine funktionelle Variante dieses Gens handelt.
- 20 4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopienzahl des *lipB*-Gens in der Zelle erhöht ist oder die Expression des *lipB*-Gens, vorzugsweise durch einen geeigneten Promotor, gesteigert ist.
5. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.
- 30 6. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Mikroorganismus, wie zum Beispiel einen Hefe- oder Bakterienstamm handelt.
- 35 7. Zelle nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um einen Stamm der Art *Escherichia coli* handelt.

8. Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein *lipB*-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.
- 5 9. Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangszelle eine Zelle eines pro- oder eukaryontischen Organismus eingesetzt wird, die in der Lage ist, R- α -Liponsäure zu synthetisieren, die einem rekombinanten Verfahren zugänglich ist und die durch Fermentation kultivierbar ist.
- 15 11. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- α -Liponsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- α -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet
20 und die enantiomerenreine R- α -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- α -Liponsäure durch Zentrifugation des Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- α -Liponsäure erfolgt.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen in einem Minimalsalzmedium als Kulturmedium unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Zellen und ein Verfahren zur Herstellung von R- α -Liponsäure mittels Fermentation.

5

Der erfindungsgemäße Wirtsorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von R- α -Liponsäure geeignet ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß er ein Gen codierend für eine Lipoyl-Protein-Ligase B überexprimiert und die gebildete R- α -

10

Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet.

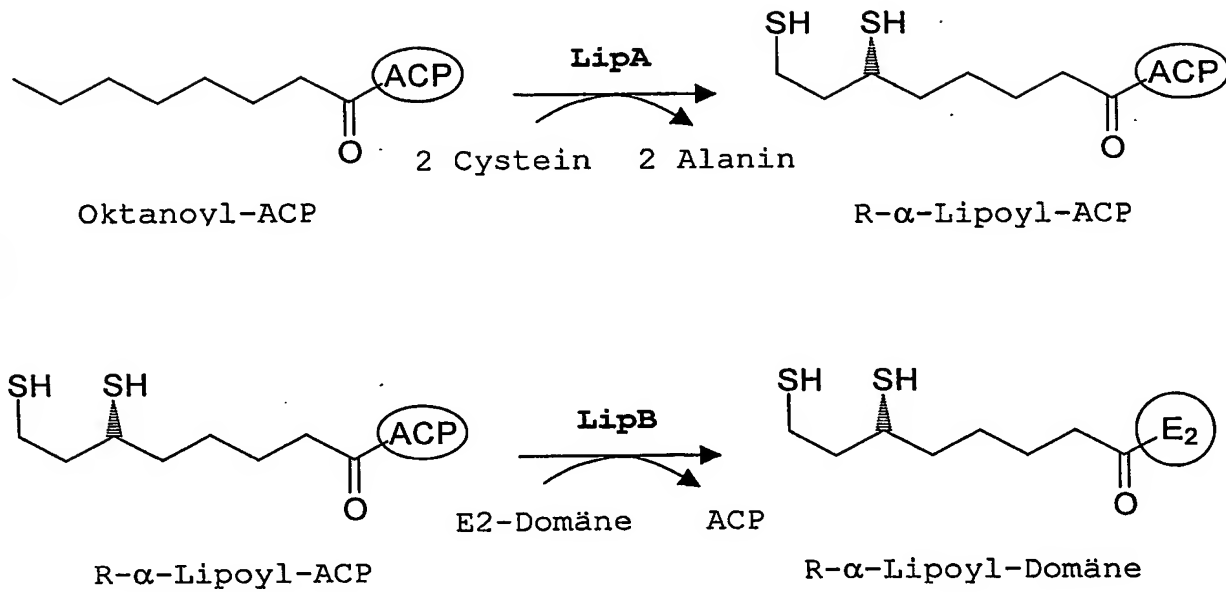
Fig. 1: Synthese der R- α -Liponsäure in *E. coli*

Fig. 2: Vektor pBAD-lipB

